

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/75127 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/63

[DE/DE]; Paul Keller Strasse 6, 82131 Stockdorf (DE).  
WATTLER, Sigrid [DE/DE]; Bennostrasse 11a, 82131  
Stockdorf (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01133

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. März 2001 (22.03.2001)

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5,  
81679 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 16 523.0 3. April 2000 (03.04.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): INGENIUM PHARMACEUTICALS AG  
[DE/DE]; Fraunhoferstrasse 13, 82152 Martinsried (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

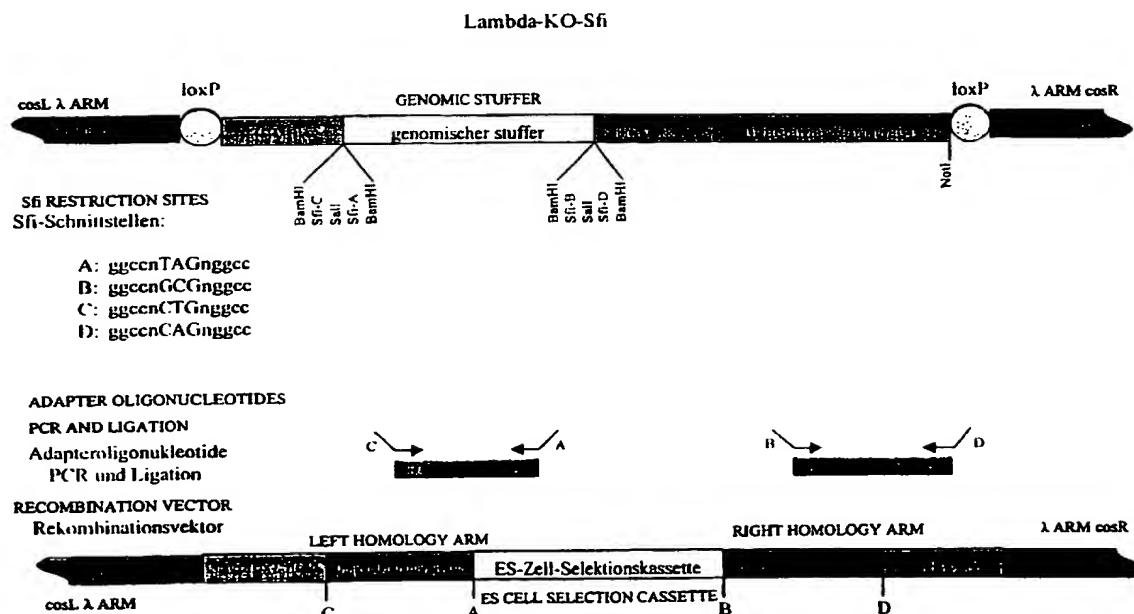
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEHLS, Michael

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CLONING SYSTEM USED IN THE CONSTRUCTION OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION VECTORS

(54) Bezeichnung: KLONIERUNGSSYSTEM ZUR KONSTRUKTION VON HOMOLOGEN REKOMBINATIONSVEKTOREN



(57) Abstract: The invention relates to a novel cloning system that consists of a vector and adapter system that substantially simplifies the construction of homologous recombination vectors used for the mutagenesis of genes in living eukaryotic cells. The invention further relates to a method for producing homologous recombination vectors as well as to the use of said cloning system for modifying the genome at defined loci in eukaryotic cells, especially in embryonic stem cells.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/75127 A2



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

---

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein neues Klonierungssystem, bestehend aus einem Vektor- und Adaptersystem, das die Konstruktion von homologen Rekombinationsvektoren zur Mutagenese von Genen in lebenden eukaryontischen Zellen erheblich vereinfacht. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung homologer Rekombinationsvektoren. Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung des Klonierungssystems, um in eukaryontischen Zellen, insbesondere embryonalen Stammzellen, das Genom an definierten Loci zu verändern.

## **Klonierungssystem zur Konstruktion von homologen Rekombinationsvektoren**

Die Erfindung betrifft ein neues Klonierungssystem, bestehend aus einem Vektor- und  
5 Adaptersystem, das die Konstruktion von homologen Rekombinationsvektoren zur  
Mutagenese von Genen in lebenden eukaryontischen Zellen erheblich vereinfacht. Weiterhin  
betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung homologer Rekombinationsvektoren.  
Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung des Klonierungssystems, um in  
eukaryontischen Zellen, insbesondere embryonalen Stammzellen, das Genom an definierten  
10 Loci zu verändern.

In der Literatur sind zahlreiche Verfahren beschrieben, wie anhand chromosomaler  
Veränderungen an Genen deren Expression bzw. Struktur verändert werden kann. (Capechi,  
M. R. (1989), Altering the genome by homologous recombination, Science 244:1288-1292;  
15 Bradley, A., Hasty, P., Davis, A. and Ramirez-Solis, R. (1992), Modifying the mouse: design and  
desire, Bio/Technology 10:534-539.)

Die gezielte Mutagenese wird mit dem Verfahren der homologen Rekombination  
durchgeführt. Dabei rekombiniert ein in eine Zelle eingebrachter synthetischer Vektor, der  
20 Teile des zu verändernden chromosomalen Lokus enthält, mit der genomischen DNA der  
Zelle. (Clarke, A. R. (1994), Murine genetic models for human diseases, Curr. Opin. Genet.  
Dev. 4:453-460; Melton, D. W. (1994), Gene targeting in the mouse, Bioassays 16:633-638.)

Die Isolierung der Zellen, in die die Vektor-DNA chromosomal integriert hat, aus dem Pool  
25 nicht-rekombinierter Zellen wird durch eine positive Selektionskassette im Vektor  
ermöglicht, die von der chromosomalen Vektor-DNA flankiert wird. Jede stabile Integration  
der Vektor-DNA führt zur dauerhaften Resistenz gegen ein zytotoxisches  
pharmakologisches Agens, welches von einem spezifischen Resistenzgen exprimiert wird.  
Beispiele dafür sind die Resistenz gegen Geneticin (G418) durch das integrierte  
30 Neomycingen oder die Resistenz gegen Hygromycin durch die Integration des  
Hygromycingens.

Die eingebrachte positive Selektionskassette kann durch die Wahl der Insertion in der  
chromosomalen Vektor-DNA zu einer Mutation des Gens im Sinne eines klassischen

Knock-outs, das heißt Inaktivierung der Genfunktion, führen. Inaktivierung bzw. Modifikation eines die Genexpression beeinflussenden regulativ wirkenden genetischen Elements bzw. funktionellen Teilbereichs des transkribierten/translatierten Genprodukts kann sowohl positiven, negativen, als auch modifizierenden Einfluß auf die Genfunktion haben. (Bradley, A., Hasty, P., Davis, A. and Ramirez-Solis, R. (1992), Modifying the mouse: design and desire, *Bio/Technology* 10:534-539; Van der Neut, R. (1997), Targeted gene disruption: Applications in Neurobiology *J. Neurosci. Methods* 71: 19-27.

Die gewünschte homologe Rekombination, die über die positive Selektionskassette verläuft, muß gegen die unerwünschte nicht-homologe Rekombination, die über die Vektorenden verläuft, selektioniert werden. Dazu werden die Vektorenden mit negativen Selektionskassetten ausgestattet, die dann häufig bei der nicht-homologen Rekombination ins Genom integriert werden (Mansour, S. L., Thomas, K. R. and Capecchi, M.R. (1988), Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes, *Nature* 336:348-352). Ein normalerweise nicht zytotoxisches Agens wird bei stabiler Expression der negativen Selektionskassetten zytotoxisch. Beispiel hierfür ist die aktivierte Zytotoxizität von Gancyclovir durch das Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Gen (HSV-tk) (Mansour, S. L., Thomas, K. R. and Capecchi, M.R. (1988), Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes, *Nature* 336:348-352).

Die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination ist abhängig von deren Isogenie mit der genomischen DNA der Zielzelle, (te Riele, H., Maandag, E. R. and Berns, A. (1992), Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5128-5132.)

Die Klonierung von chromosomalen DNA-Abschnitten des zu verändernden Lokus, der molekularbiologische Zusammenbau eines bakteriellen Plasmid-Vektors mit der entsprechenden chromosomalen DNA, die gezielte Integration der positiven Selektionskassette und das Ausstatten beider homologer Fragmente mit negativen Selektionskassetten ergeben zwangsläufig, dass die Konstruktion eines homologen Rekombinations-Vektors meist zu einem langwierigen und technisch aufwendigen Unterfangen wird. Zeitlimitierend erweist sich dabei die Notwendigkeit, für das Einbringen

der positiven Selektionskassette in die Ziel-DNA auf einzigartige Restriktionsenzymkennungssequenzen (Restriktionsschnittstellen) angewiesen zu sein. Daraus ergeben sich aufwendige, zeit- und arbeitsintensive Klonierungen. Bei der gezielten Mutagenese eines eukaryontischen Genoms mittels homologer Rekombination stellt die  
5 Konstruktion des Rekombinationsvektors daher oft den zeitlimitierenden Schritt dar. Bei den bisher bekannten Systemen, die auf der Nutzung homologer Rekombination in Hefe oder in Bakterien beruhen, sind zur Konstruktion des Rekombinationsvektors mehrere Wochen erforderlich. Es existiert bisher kein experimentelles System, welches die Fertigstellung eines Vektors für die homologe Rekombination in kurzer Zeit ermöglicht.

10

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein System bereitzustellen, welches die Konstruktion eines für die homologe Rekombination geeigneten Vektors ohne aufwendige Klonierungsschritte ermöglicht.

15 Der Erfindung liegt weiterhin die Aufgabe zugrunde, ein Klonierungssystem bereitzustellen, welches für das Einbringen der positiven Selektionskassette nicht auf einzigartige Restriktionsenzymkennungssequenzen angewiesen ist.

Die Aufgabe wird gelöst durch den Gegenstand der Patentansprüche.

20

Die Erfindung betrifft daher ein Klonierungssystem zur homologen Rekombination in eukaryontischen Zellen, bestehend aus einem Vektor-Adaptersystem, umfassend einen Lambda-Vektor mit mindestens zwei negativen Selektionskassetten, mindestens zwei in gleicher Orientierung vorliegenden loxP-Stellen, einen zwischen den loxP-Stellen  
25 befindlichen Replikationsursprung, einen Resistenzmarker für Bakterien und ein genomisches Stuffer-Fragment, flankiert von je einem 5' und 3' Restriktionsschnittstellenlinker und vier verschiedene Adapteroligonukleotide A, B, C und D, wobei die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide A, B, C und D ein zum Restriktionsenzym Sfi kompatibles Ende enthält und die 3'-Nukleotidsequenz der  
30 Adapteroligonukleotide A, B, C, und D zum jeweiligen Zielgen homolog ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der 5'- Restriktionsschnittstellenlinker die Restriktionsschnittstellen 5'-BamHI-Sfi-C, SalI, Sfi-A, BamHI und der 3'-

Restriktionsschnittstellenlinker die Restriktionsschnittstellen 3'-BamHI, Sfi-B, SalI, Sfi-D, BamHI.

5 Besonders bevorzugt ist ein Klonierungssystem, wobei die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide A und C die Restriktionsschnittstellen SfiA und SfiC und die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide B und D die Restriktionsschnittstellen SfiB und SfiD umfasst.

10 Überraschenderweise wird durch das erfindungsgemäße Klonierungssystem die Konstruktion eines positiven/negativen Rekombinationsvektors stark verkürzt und vereinfacht. Bei Verwendung des erfindungsgemäßen Klonierungssystems wird die Klonierungszeit auf drei Tage verkürzt und die Bearbeitung mehrerer Projekte in einer Zeiteinheit ermöglicht. Ein bisher aufwendiges Verfahren wird somit erheblich verkürzt und kostengünstiger.

15 Das erfindungsgemäße Klonierungssystem bestehend aus einem Vektor-Adaptersystem erlaubt es, jede beliebige DNA durch einen einzigen Klonierungsschritt in einen vollständigen Rekombinationsvektor mit flankierenden negativen Selektionskassetten umzuwandeln.

20 Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Klonierungssystem umfasst einen neu konstruierten Lambda-Vektor (Lambda-KO-Sfi), wie in Abbildung 1 dargestellt.

25 Die im erfindungsgemäßen Klonierungssystem eingesetzten Adapteroligonukleotide ermöglichen die effiziente Amplifikation der zu mutierenden genomischen Sequenz (nachfolgend auch als rechter und linker Homologiearm bezeichnet).

30 Die Adapteroligonukleotide sind so aufgebaut, dass 15-50, vorzugsweise 20-25 Basenpaare (bp) der 3'-Nukleotidsequenz zum jeweiligen Zielgen homolog sind und die 5'-Nukleotidsequenz ein zum Restriktionsenzym Sfi kompatibles Ende enthält. Das Restriktionsenzym Sfi ermöglicht die Konstruktion von mehreren unabhängigen Schnittstellen aufgrund der frei wählbaren mittleren drei Basenpaare seiner Restriktionserkennungssequenz.

Zur Amplifikation der Homologiearme werden für den rechten Arm die Adapteroligonukleotide mit den Restriktionsschnittstellen SfiB und SfiD und für den linken Arm Adapteroligonukleotide mit den Restriktionsschnittstellen SfiA und SfiC definiert. Demgemäß werden der rechte Homologiearm mit den Adapteroligos B und D und der linke Homologiearm mit den Adapteroligonukleotide A und C amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt dabei unter Verwendung einer Polymerase mit 3'-5' Exonuklease-Aktivität, so dass die Wahrscheinlichkeit falsch eingebauter Basen minimiert wird.

Die Größe der PCR-Produkte und damit die Länge der Homologie ist frei wählbar. Die beiden PCR-Produkte werden in einem Ligationsansatz mit der positiven Selektionskassette, die die Restriktionsschnittstellen SfiA und SfiB besitzt sowie mit dem Lambda-KO-Sfi-Gerüst, dass die Restriktionsschnittstellen SfiC und SfiD enthält, ligiert. Es sind somit mittels nur einem Restriktionsenzym vier nicht kompatible Restriktionsschnittstellen konstruiert worden, wodurch die Ligation der vier Fragmente nur in einer Weise erfolgen kann und die Klonierung ohne falsche Ligationsprodukte verläuft, die ansonsten zu background führen. Darüberhinaus macht sich die Erfindung die hohe Klonierungskapazität von Lambdaphagen zunutze.

Die PCR-Produkte der Homologiearme sind auch dann klonierbar, wenn nur geringste Mengen synthetisiert worden sind. Damit wird ein aufwendiges Austesten von Idealbedingungen für PCR-Reaktionen mit Proof-Reading-Polymerasen vermieden. Die Klonierung des Rekombinationsvektors ist unabhängig von in der genomischen DNA vorhandenen Restriktionsschnittstellen, dies erlaubt die positive Selektionskassette an jede beliebige Position im Genom zu plazieren und auch größere Deletionen zu setzen. Nach Erhalt der Adapteroligonukleotide ist der Rekombinationsvektor in drei Tagen fertig gestellt.

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

### Der Lambdavektor KO-Sfi

Der Lambdavektor KO-Sfi (siehe Fig. 1) ist von dem Lambdavektor KO (Nehls et al. (1994), *Biotechniques* 17:4:770-775) abgeleitet. Der Lambdavektor KO beruht auf dem Vektor Lambda 2001 (Ausubel et al., (1994), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley

& Sons, New York). Jedes in den Vektor inserierte genomische Fragment ist automatisch von zwei negativen Selektionskassetten, zum Beispiel HSV-*tk*, flankiert. Der Vektor enthält weiterhin zwei in gleicher Orientierung gerichtete loxP-Stellen mit der Nukleotidsequenz ATAACCTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT. Diese loxP-Stellen ermöglichen nach Infektion des Phagen mit einem cre-Rekombinase exprimierenden Bakterienstamm (wie z.B. BNN132) die Konvertierung des Phagen in ein Plasmid. Die Propagation des Plasmids wird durch einen innerhalb der loxP-Stellen befindlichen Replikationsursprung und Resistenzmarker für Bakterien ermöglicht, wie zum Beispiel pBluescript (Stratagene, Bestellnummer #211201).

Bei der Konstruktion des Lambdavektors wurde zwischen die beiden Thymidinkinasegene (HSV-*tk*) ein genomisches Fragment des Phagen, vorzugsweise von ca. 5Kb, (hier auch als Stuffer-Fragment bezeichnet) plaziert, um die Propagation des Phagen zu gewährleisten. Dabei wurde ein Restriktionsschnittstellenlinker mit folgendem Aufbau eingesetzt (siehe auch Fig. 1):

5'- BamHI- Sfi-C, Sall, Sfi-A, BamHI

3'- BamHI, Sfi-B, Sall, Sfi-D, BamHI

Die Sfi-Schnittstellen besitzen die folgenden Sequenzen:

Sfi A: ggccntagnggcc

Sfi B: ggccngcgnggcc

Sfi C: ggccnctgnggcc

Sfi D: ggccncagnggcc

Aus den vorstehend genannten neu eingebrachten Linkersequenzen wurden zudem zwei, für die jeweiligen Enden spezifischen Sequenzierprimer abgeleitet:

MM-D 5'-gacggatcctcgccactg

MM-C 5'-ctcgaggatccggccactg

Zur Verwendung als Klonierungsvektor wird die Lambdaphagen-DNA zunächst mit Sfi hydrolytisch gespalten. Die erhaltenen Fragmente werden gereinigt und in einem zweiten Verdau mit dem Restriktionsenzym Sall geschnitten. Damit sollte jedes Ende dreimal



geschnitten sein und Religationsprodukte bei der Klonierung vermieden werden. Die Lambda-Arme werden dann durch Sucrosegradientenzentrifugation gereinigt und auf diese Weise von dem Stuffer-Fragment getrennt. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgt unter Standardbedingungen und die *in vitro* Verpackung erfolgt unter Verwendung eines von  
5 Stratagene hergestellten Verpackungsextraktes (Gigapack plus).

### Die Adapteroligonukleotide (siehe auch Fig. 1)

Die Adapteroligonukleotide dienen zur Amplifikation der Homologiearme (*0.8 – 12 kb*) der  
10 zu mutierenden genomischen Sequenz und zum Einbau dieser amplifizierten Sequenzen in den Klonierungsvektor Lambda-KO-Sfi.

Die 5'-Enden der Adapteroligonukleotide A, B, C und D definieren jeweils die vier verschiedenen Sfi-Schnittstellen. Nach Amplifikation der genomischen Sequenzen, d.h. des  
15 rechten und linken Homologiearmes, und Aufreinigung der beiden PCR-Produkte werden diese mit Sfi hydrolytisch gespalten. Um eine vollständige Spaltung zu gewährleisten, wurden an den 5'-Enden der Adapteroligonukleotide zusätzlich drei Nukleotide plaziert (in nachfolgender Aufstellung unterstrichen dargestellt). Am 3'-Ende der Adapteroligonukleotide befindet sich eine zur Nukleotidsequenz des jeweiligen  
20 Kandidatengens homologe Nukleotidsequenz (in nachfolgender Aufstellung als (N<sub>genomisch</sub>)<sub>25</sub> dargestellt).

Sfi-A: cga ggc cgc tat ggc c(N<sub>genomisch</sub>)<sub>25</sub>

Sfi-B: gac ggc cag cga ggc c(N<sub>genomisch</sub>)<sub>25</sub>

25 Sfi-C: cag ggc cac tgc ggc c (N<sub>genomisch</sub>)<sub>25</sub>

Sfi-D: cag ggc cac tgc ggc c (N<sub>genomisch</sub>)<sub>25</sub>

### Die Selektionskassette

30 Um bei einem Knock-out eines Gens gleichzeitig die Expression des endogenen Gens überwachen zu können, wurde eine IRES-β-Galaktosidase-MCS-Neomycin-Kassette mit den Sfi Schnittstellen A und B versehen und in den LambdaKO-Sfi-Vektor als Stuffer-Fragment inkloniert. Auf diese Weise kann gleichzeitig die Expression des endogenen Gens

überwacht werden. Bei einer Lambda-Phagen-DNA-Präparation fällt daher auch DNA der Selektionskassette im molaren Verhältnis an, die gleichzeitig mitgereinigt werden kann.

**5 Die verwendeten Abkürzungen besitzen erfindungsgemäß die folgende Bedeutung:**

Außer den im Duden gebräuchlichen Abkürzungen, den üblichen Codes für Aminosäuren und Nukleotide sowie den gängigen Kürzeln für Restriktionsenzyme, Polymerasen, usw. wurden folgende Abkürzungen verwendet:

10

Bp	Basenpaar
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>hprt</i> -Gen	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferasegen
HSK	Herpes Simplex Virus
MCS	multiple cloning site
µl	Mikroliter
Ng	Nanogramm
Ori	Origin of replication
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>tk</i> -Gen	Thymidin-Kinase-Gen
U	Unit

Die Erfindung wird weiter durch die folgende Zeichnung erläutert:

15 Figur 1A zeigt eine graphische Darstellung eines erfindungsgemäßen Klonierungssystems, bestehend aus einem Lambda-Vektor (Lambda-KO-Sfi) und vier Adapteroligonukleotiden A, B, C und D.

20 Der Lambda KO-Sfi: Der LambdaKo-Sfi Vektor besteht aus dem rechten und linken Arm des Lambda2001 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.), der von Nehls et al. abgeändert wurde (Nehls et al. (1994), Biotechniques 17:4:770-775): angrenzend an die Lambdaarme wurden zwei in gleicher Orientierung gerichtete loxP-Stellen eingebracht. Zwischen die loxP-Stellen wurde in den

rechten Lambdaarm das Gen für die  $\beta$ -Lactamase sowie ein Replikationsursprung (ori) inseriert. Ein genomisches Stuffer-Fragment ist beidseits von zwei Kassetten für die negative Selektion flankiert. (Mansour, S. L., Thomas, K. R. and Capechi, M.R. (1988), Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes, Nature 336:348-352). An das 5'- Ende des Stuffer-Fragmentes wurde folgender Restriktionschnittstellenlinker neu eingebracht: BamHI- Sfi-C, SalI, Sfi-A, BamHI und ein zweiter Restriktionschnittstellenlinker an das 3'- Ende des Stuffer-Fragmentes: BamHI, Sfi-B, SalI, Sfi-D, BamHI. Die Sfi-Schnittstellen sind folgendermaßen definiert: Sfi-A: ggccNTAGNggcc; Sfi-B: ggccNGCGNggcc; Sfi-C: ggccNCTGNggcc; Sfi-D: ggccNCAGNggcc.

Figur 1B zeigt einen homologen Rekombinationsvektor zur gezielten Mutagenese von ES-Zellen, der aus den gereinigten, Sfi geschnittenen Lambda KO-Sfi-Armen besteht, in denen die PCR-Produkte (rechter und linker Homologiearm) und die ES-Zell-Selektionskassette in einem Ligationschritt ligiert wurden. Dazu wurde der linke Homologiearm mit den Adapteroligonukleotiden C und A amplifiziert, der rechte Arm mit den Adapteroligonukleotiden B und D. Die Gesamtgröße der beiden PCR-Produkte kann dabei in den Grenzen von 0.8-12 kb frei gewählt werden.

## Beispiele

Die nachstehenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, sind jedoch nicht begrenzend zu verstehen.

### **Beispiel 1:**

#### **Konstruktion eines homologen Rekombinationsvektors für das Hprt-Gen**

Zur Konstruktion eines homologen Rekombinationsvektors für das Hprt-Gen wurden die folgenden experimentellen Schritte durchgeführt:

#### **A. Auswählen genomischer Oligonukleotide für die PCR der Homologiearme**

Im gewählten Beispiel wird das Exon III des Hprt-Gens deletiert. Diese Mutation führt zum Funktionsverlust von Hprt, wie bereits von Hasty et al. (1991), *Mol. Cell Biol.* 11:5586-5591, beschrieben.

Der linke Homologiearm von Hprt ist 3639 bp lang und endet mit der 17ten Base des 3ten Exons. Der rechte Homologiearm, der 950 bp lang ist, beginnt im 3ten Intron mit der 39ten Base. Die in der nachfolgenden Aufstellung fettgedruckten Basen kennzeichnen die Adaptersequenzen.

Sfi-A    **cga ggc cgc tat ggc c** ga gca agt ctt tca gtc cta tag  
Sfi-B    **gac ggc cag cga ggc c** gg gcc att cta gtt tta tct ata  
Sfi-C    **gca ggc cac tgc ggc c** gg tta gaa gaa ttg gct ctc gtt g  
Sfi-D    **cag ggc cac tgc ggc c** gc agt ttt acc tgc atg ccc

#### **B. Genomische PCR**

30

Die PCR wurde mit den folgenden Reagenzien durchgeführt:

Template	50-100 ng	Genomische DNA aus ES-Zellen des Maus-Stammes 129
Oligonukleotide	2.5 ng/μl	MWG ultrapure gereinigt
dNTP's	2 mM	Pharmacia, Bestellnummer #27-2035-02
Taq-Polymerase	0.5 U	Boehringer, Expand high fidelity PCR System # 1732650
10 x Buffer	1 x	Arbeitskonzentration

Die Denaturierung erfolgte für 45 Sekunden bei 94°C, das Anlagern der Oligonukleotide ("Annealing") für 1 Minute bei 56°C, die Synthese für 3 Minuten bei 72°C. Dieser Zyklus wurde 34 mal wiederholt.

5

### **C.     Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit (Bestellnummer #21806) nach den Beschreibungen des Herstellers aufgereinigt. Das Elutionsvolumen betrug 30 μl.

10

### **D.     Sfi-Verdau der PCR-Produkte**

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde im 50 μl Ansatz mit 40 U Sfi (Biolabs, Bestellnummer #123L) drei Stunden bei 50°C verdaut und anschließend wiederum unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in 30 μl von der Säule eluiert.

15

### **E.     Ligation der Sfi-geschnittenen PCR-Produkte mit Lambda-KO-Sfi und der positiven Selektionskassette**

20

Ein typischer Ligationsansatz bestand aus folgenden Mengen in einem 10 μl Ansatz:

50 ng	Lambda-KO-Sfi-Arme (Sfi geschnitten)
10 ng	Selektionskassette (Sfi geschnitten)
1 ng	rechter Homologiearm
1 ng	linker Homologiearm

- 1 x        Ligationspuffer (Boehringer)
- 1 U        T4-Ligase (Boehringer, Bestellnummer #716354)

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für zwei Stunden.

#### **F.     In vitro-Verpackung**

5

2 µl des vorstehend genannten Ligationsansatzes wurden für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur mit 10 µl Verpackungsextrakt *in vitro* verpackt (Stratagene, Gigapack III plus, Bestellnummer #200204).

#### **G.     Plattierung der Library**

Je 10 und 50 µl der Verpackungsreaktion wurden zur Infektion mit je 300 µl einer wachsenden Kultur von C600-Bakterien (Stratagene, Bestellnummer #200261) verwendet und auf Lambda-Platten (Current Protocol in Molecular Biology) über Nacht inkubiert.

15

#### **H.     Plasmidkonvertierung**

Einzelplaques wurden in 500 µl SM-Phagenpuffer (Ausubel, F.M. et al., (1994) Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) aufgenommen. Je 50 µl Phagen in SM-Phagenpuffer wurden mit 100 µl einer wachsenden Kultur BNN 132 infiziert (30 Minuten, 37°C) und dann eine Flüssigkultur TB Medium (Ausubel, F.M. et al., (1994) Current Protocol in Molecular Biology John Wiley & Sons, New York) plus 100 µg Ampicillin/ml (Amersham, Bestellnummer #US11259-25) angeimpft und über Nacht bei 30°C im Bakterienschüttler inkubiert.

25

#### **I.     Plasmidpräparation**

Die Plasmid-DNA wurde über QIAgen-Säulenchromatografie (Qiagen, Bestellnummer #12143) nach den Angaben des Herstellers gewonnen.

30

## PATENTANSPRÜCHE

1. Klonierungssystem zur homologen Rekombination in eukaryontischen Zellen, bestehend aus einem Vektor-Adaptersystem, umfassend

5 einen Lambda-Vektor, gekennzeichnet dadurch dass dieser

- a) mindestens zwei negative Selektionskassetten
- b) mindestens zwei in gleicher Orientierung vorliegende loxP-Stellen
- c) einen zwischen den loxP-Stellen befindlichen Replikationsursprung
- 10 d) einen Resistenzmarker für Bakterien; und
- e) ein genomisches Stuffer-Fragment, flankiert von je einem 5' und 3' Restriktionsschnittstellenlinker, enthält;

und vier verschiedene Adapteroligonukleotide A, B, C und D, wobei die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide A, B, C und D ein zum Restriktionsenzym Sfi kompatibles Ende enthält und die 3'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide A, B, C, und D zum jeweiligen Zielgen homolog ist.

2. Klonierungssystem gemäß Anspruch 1, wobei der 5'-Restriktionsschnittstellenlinker die Restriktionsschnittstellen 5'-BamHI-Sfi-C, Sall, Sfi-A, BamHI und der 3'-Restriktionsschnittstellenlinker die Restriktionsschnittstellen 3'-BamHI, Sfi-B, Sall, Sfi-D, BamHI umfasst.

3. Klonierungssystem gemäß Anspruch 1, wobei

25 die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide A die Restriktionsschnittstellen SfiA,

die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide C die Restriktionsschnittstellen SfiC,

30 die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide B die Restriktionsschnittstellen SfiB, und

die 5'-Nukleotidsequenz der Adapteroligonukleotide D die Restriktionsschnittstellen SfiD umfasst.

4. Klonierungssystem gemäß Anspruch 1, wobei die zum jeweiligen Zielgen homologe 3' Nukleotidsequenz der Adapternukleotide A, B, C, und D 15 bis 50 bp, vorzugsweise 20-25 bp umfasst.

5

5. Verfahren zur Herstellung eines homologen Rekombinationsvektors, bestehend aus

einem Lambda-Vektor

10 mindestens zwei negativen Selektionskassetten,  
mindestens einer positiven Selektionskassette und  
einem linken und rechten Homologiearm

umfassend die Schritte:

- 15 a) Auswählen von zum Zielgen homologer Sequenzen (genomischer Oligonukleotide) zur Amplifikation der 5'- und 3'-Homologiearme mittels PCR;  
b) Amplifikation der 5'- und 3'-Homologiearme mittels PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte;  
c) Restriktionsverdau der aufgereinigten PCR-Produkte mittels Restriktionsenzym Sfi;  
20 d) Ligation der Sfi-geschnittenen Fragmente mit einem Sfi-geschnittenen Lambda-Vektor und einer Sfi-geschnittenen positiven Selektionskassette;  
e) *in vitro*-Verpackung der Ligationsprodukte und Plattierung der Phagenbibliothek; und  
25 f) Plasmidkonvertierung und Gewinnung der DNA des homologen Rekombinationsvektors.

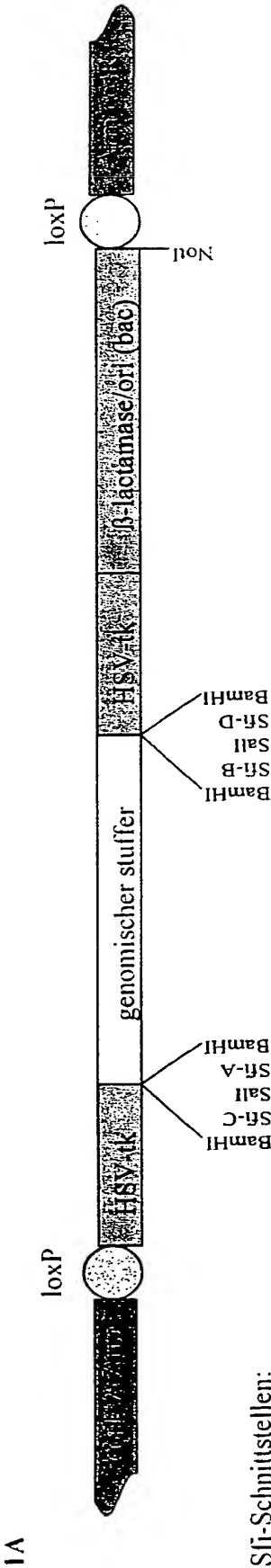
6. Verfahren zur Herstellung eines homologen Rekombinationsvektors gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch, dass der Lambda-Vektor Lambda KO-Sfi ist.

30

7. Verwendung des Klonierungssystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 um in eukaryontischen Zellen, insbesondere embryonalen Stammzellen, das Genom an definierten Loci zu verändern.



Lambda-KO-Sfi



Sfi-Schnittstellen:

- A: ggccnTAgnggcc  
B: ggccnGCgnggcc  
C: ggccnCTGnggcc  
D: ggccnCAgnggcc

1B



Rekombinationsvektor



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ingenium Pharmaceuticals AG

<120> Klonierungssystem zur Konstruktion von homologen Rekombinationsvektoren

<130> 220-32 PCT

<140> PCT/DE/xxxxxxxxxx

<141> 2001-03-22

<150> DE 100 16 523.0

<151> 2000-04-03

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:loxP-Stelle

<400> 1

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat

34

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz: Restriktionsschnittstelle Sfi A, wobei n  
jedes beliebige Nukleotid ist

<400> 2

ggccntagn ggc

13

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz: Restriktionsschnittstelle Sfi B, wobei n  
jedes beliebige Nukleotid ist

<400> 3

ggccngcgng gcc

13

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi C, wobei n  
jedes beliebige Nukleotid ist

<400> 4

ggccnctgng gcc

13

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi D, wobei n  
jedes beliebige Nukleotid ist

<400> 5

gccncagnng cc

12

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi A

<400> 6

cgaggccgct atggcc

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi B

<400> 7

gacggccagc gaggcc

16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi C

<400> 8

cagggccact gcggcc

16

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Restriktionsschnittstelle Sfi D

<400> 9

cagggccact gcggcc

16

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Sequenzierprimer MM-D

<400> 10

gacggatcct cggccactg

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Sequenzierprimer MM-C

<400> 11

ctcgaggatc cggccactg

19





(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/75127 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/66.**  
15/90

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01133

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. März 2001 (22.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 16 523.0 3. April 2000 (03.04.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **INGENIUM PHARMACEUTICALS AG**  
[DE/DE]; Fraunhoferstrasse 13, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **NEHLS, Michael**  
[DE/DE]; Paul Keller Strasse 6, 82131 Stockdorf (DE).  
**WATTLER, Sigrid** [DE/DE]; Bennostrasse 11a, 82131  
Stockdorf (DE).

(74) Anwälte: **VOSSIUS, Volker** usw.; Holbeinstrasse 5,  
81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

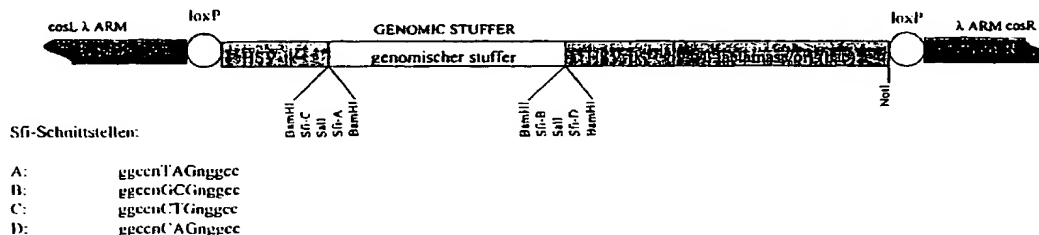
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 7. Februar 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CLONING SYSTEM USED IN THE CONSTRUCTION OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION VECTORS

(54) Bezeichnung: KLONIERUNGSSYSTEM ZUR KONSTRUKTION VON HOMOLOGEN REKOMBINATIONSVEKTOREN

Lambda-KO-Sfi



(57) Abstract: The invention relates to a novel cloning system that consists of a vector and adapter system that substantially simplifies the construction of homologous recombination vectors used for the mutagenesis of genes in living eukaryotic cells. The invention further relates to a method for producing homologous recombination vectors as well as to the use of said cloning system for modifying the genome at defined loci in eukaryotic cells, especially in embryonic stem cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Klonierungssystem, bestehend aus einem Vektor- und Adaptersystem, das die Konstruktion von homologen Rekombinationsvektoren zur Mutagenese von Genen in lebenden eukaryontischen Zellen erheblich vereinfacht. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung homologer Rekombinationsvektoren. Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung des Klonierungssystems, um in eukaryontischen Zellen, insbesondere embryonalen Stammzellen, das Genom an definierten Loci zu verändern.

WO 01/75127 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01133

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/66 C12N15/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WATTLER S ET AL: "Construction of gene targeting vectors from lambda KOS genomic libraries" BIOTECHNIQUES, vol. 26, no. 6, June 1999 (1999-06), page 1150-1156, 1158, 1160 XP002179272 figures 2A,3 ---	1-7
Y	WO 98 37175 A (NEHLS MICHAEL ;WATTLER SIGRID (US)) 27 August 1998 (1998-08-27) figure 2 ---	1-7
Y	WO 00 09681 A (LEXICON GENETICS INC) 24 February 2000 (2000-02-24) figures 1C,1D --- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 October 2001

Date of mailing of the international search report

17/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, O

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel. Patent Application No

PCT/DE 01/01133

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ZELENETZ A ET AL: "Directional cloning of cDNA using a selectable SfiI cassette" GEN , vol. 89, no. 1, 30 April 1990 (1990-04-30), pages 123-127, XP002179273 figures 2,3</p> <p>---</p>	1-7
A	<p>NEHLS M ET AL: "Two large insert vectors, lambda PS and lambda KO, facilitate rapid mapping and targeted disruption of mammalian genes" BIOTECHNIQUES, vol. 17, no. 4, October 1994 (1994-10), pages 770-775, XP002179274 cited in the application figure 3</p> <p>---</p>	
A	<p>TSUZUKI T ET AL: "Embryonic stem cell gene targeting using bacteriophage lambda vectors generated by phage-plasmid recombination" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 26, no. 4, 15 February 1998 (1998-02-15), pages 988-993, XP002179275</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01133

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9837175	A	27-08-1998	EP	0912722 A1		06-05-1999
			WO	9837175 A1		27-08-1998
WO 0009681	A	24-02-2000	AU	5470399 A		06-03-2000
			EP	1105471 A2		13-06-2001
			WO	0009681 A2		24-02-2000
			US	6218123 B1		17-04-2001

## PCT/DE 01/01133

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01133

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ZELENETZ A ET AL: "Directional cloning of cDNA using a selectable SfiI cassette" GEN , Bd. 89, Nr. 1, 30. April 1990 (1990-04-30), Seiten 123-127, XP002179273 Abbildungen 2,3</p> <p>---</p>	1-7
A	<p>NEHLS M ET AL: "Two large insert vectors, lambda PS and lambda KO, facilitate rapid mapping and targeted disruption of mammalian genes" BIOTECHNIQUES, Bd. 17, Nr. 4, Oktober 1994 (1994-10), Seiten 770-775, XP002179274 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 3</p> <p>---</p>	
A	<p>TSUZUKI T ET AL: "Embryonic stem cell gene targeting using bacteriophage lambda vectors generated by phage-plasmid recombination" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., Bd. 26, Nr. 4, 15. Februar 1998 (1998-02-15), Seiten 988-993, XP002179275</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01133

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9837175	A	27-08-1998	EP 0912722 A1	06-05-1999
			WO 9837175 A1	27-08-1998
WO 0009681	A	24-02-2000	AU 5470399 A	06-03-2000
			EP 1105471 A2	13-06-2001
			WO 0009681 A2	24-02-2000
			US 6218123 B1	17-04-2001

